

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06499

研究課題名(和文) シナプス安定性に関する微細形態解析

研究課題名(英文) Ultrastructural analysis of synapse stability

研究代表者

岩崎 広英 (Iwasaki, Hirohide)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30342752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、シナプスの安定化をもたらす分子的基盤の解明を旨とした。まず、大脳皮質錐体細胞の樹状突起スパインを二光子顕微鏡で経時的にin vivoイメージングし、安定して維持されるスパインと新たに出現したスパインを同定した。次に同じ樹状突起を電子顕微鏡で観察して樹状突起スパインの三次元再構築像を得た。その結果、安定スパインと新生スパインとはネックの長さはほぼ同じであるが、安定スパインではスパインヘッドが大きく、形態も複雑であった。さらにシナプス安定化の分子メカニズムの解明のため、シナプス誘導に関わる膜タンパク質であるテニューリンのシナプス形成過程における役割について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳が長期にわたり安定に記憶を保持するためにはシナプスが長期にわたって安定的に維持される必要がある。一方、新しいことを学習したり外界の変化に応じて柔軟に対応したりするためにはシナプスが可塑的である必要がある。本研究課題では、安定して維持されるスパインの形がどのようなものであるかを明らかにした。スパインの安定性は自閉症などの発達障害や精神疾患とも関連しており、スパインを安定に維持させるしくみの解明や、どのような分子がスパインの安定化に関わっているのかが明らかになれば、発達障害や精神疾患の病因・病態の理解につながるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：This project focused on the molecular mechanism of synaptic stabilization. First, dendritic spines of cortical pyramidal neurons were imaged in vivo using two-photon microscopy over time to identify stably maintained spines and newly emerging spines. The same dendrites were then examined by electron microscopy to obtain ultrastructural images of dendritic spines by three-dimensional reconstruction. The results showed that the neck length of the stable spines was almost the same as that of the newly emerged spines, but the spine head of the stable spines was larger and the morphology more complex. In addition, to elucidate the molecular mechanism of synaptic stabilization, we clarified the role of teneurin, a membrane protein involved in synaptic induction.

研究分野：神経形態学

キーワード：シナプス 光学顕微鏡 電子顕微鏡 光-電子相関顕微鏡法

1. 研究開始当初の背景

脳が長期にわたり安定に記憶を保持するためにはシナプスが長期にわたって安定的に維持される必要がある。一方、新しいことを学習したり外界の変化に応じて柔軟に対応したりするためにはシナプスが可塑的である必要がある。本研究課題は、シナプスの安定化をもたらす分子的基盤の解明を目的とし、大脳皮質錐体細胞におけるスパインの安定性とスパインの形態との関連について解析した。

具体的な手法としては、まずスパインの安定性について調べるために二光子励起レーザー顕微鏡を用い、マウス大脳皮質体性感覚野の神経細胞の同一の樹状突起を長期間にわたって観察した。その後、同じ部位を電子顕微鏡で同定し、電子顕微鏡によるスパインの立体再構築像を得た。これにより長期にわたって安定なスパインと新たに生成されたスパインに特徴的な形態学的特性について解析した。しかし研究開始当初は、二光子顕微鏡で観察したスパインと同じスパインを再現性良く電子顕微鏡で同定するため手法が確立されておらず、同じスパインを光学顕微鏡と電子顕微鏡で照合することは困難であった。

2. 研究の目的

本研究課題は、シナプスの安定化をもたらす分子的基盤の解明を目指し、大脳皮質錐体細胞における樹状突起スパインの安定性と形態的特性との関連について、光学顕微鏡と電子顕微鏡を併用した光-電子相関顕微鏡法により解析することを目的とした。さらにシナプス安定化機構を分子レベルで解明するために、興奮性および抑制性シナプスの誘導に関わる膜タンパク質分子であるテニューリン2に着目し、テニューリン2を介したシナプス誘導について、特に細胞骨格タンパク質との関連に注目して解析した。

3. 研究の方法

まずマウス大脳皮質錐体細胞に GFP-PSD95 と DsRed を *in utero* electroporation を用いて遺伝子導入した。GFP-PSD95 は成熟したスパインに集積することからスパインの観察に用いた。一方、DsRed は細胞全体を標識するための volume マーカーとして使用した。これらの蛍光タンパク質を導入したマウス大脳皮質錐体細胞を二光子顕微鏡を用いて観察した後、同じ箇所を効率的に電子顕微鏡で同定し、樹状突起スパインを三次元再構築した。In vivo イメージングでは頭蓋骨を薄く削る、いわゆる thinned skull 法を用い、同一の樹状突起を経時的に観察することで樹状突起スパインを長期にわたり観察した。次に、光学顕微鏡で観察したのと同じ箇所を電子顕微鏡で観察するための手法を開発した。具体的には二光子顕微鏡による最後の観察を終えた後、マウスを還流固定し、脳をスライス化した後で、二光子顕微鏡のレーザーのレーザーパワーを上げてスライスに焼灼痕を作成し、この焼灼痕を指標として標的となる樹状突起をマークした。次にこの脳スライスに電子顕微鏡用試料作製のため、オスミウム酸による固定や酢酸ウランを用いた電子染色を施し、脱水後、Durcupan 樹脂に包埋した。樹脂包埋した脳スライスをトリミング加工し、FIB-SEM で観察するための一連のプロトコールを完成させた。FIB-SEM による観察に当たってはこの焼灼痕を指標とし、取得した画像を用いて標的の樹状突起スパインの三次元再構築を行った。

一方、テニューリン2を介した解析については、遺伝子導入とその後の観察が容易な海馬初代分散培養系を用いた。抑制性シナプスの集積については抗 gephyrin 抗体を用いた免疫染色により評価した。

4. 研究成果

まず、前項において示した光-電子相関顕微鏡法による同一視野観察のための手法を確立した。In vivo イメージングから電子顕微鏡観察までの一連のステップを詳細に検討し、二光子顕微鏡で観察した樹状突起スパインを再現性良く電子顕微鏡像で同定するためのプロトコルを確立した。次に、この手法を用いて安定スパインと新生スパインの形態を比較したところ、スパインネックの長さは安定スパインと新生スパインの間で変わらないのに対し、安定スパインの方が新生スパインに比べ大きなスパインヘッドを有することが確認された。また安定スパインのスパインヘッドの形態は比較的複雑で多岐にわたるのに対し、新生スパインのスパインヘッドは単純な形態をとるものが多いことが確認できた。さらにこれらのスパインとシナプス結合する軸索を同定し、軸索の形態や、同じ軸索に結合するスパイン同士の状態についても解析を行った。光学顕微鏡によるシナプス観察においては、蛍光標識された樹状突起上のシナプス後部の形態を観察することは容易であるが、これとシナプスを形成する軸索を同定し、その形態を観察することは困難である。本研究で確立した光-電子相関顕微鏡法によるシナプス観察では、前シナプスを形成する軸索の形態学的特徴について観察することが可能であり、シナプス観察において有用といえる。

さらに、中枢神経系におけるシナプスの安定化機構の分子メカニズムの解明を目指し、特にシナプス誘導に関わる膜分子であるテニューリン2に注目した。テニューリンは様々な種において広く保存されている膜タンパク質であり、哺乳類では4種類のタイプがある。このうちテニューリン2については、これまでの研究からシナプス形成や神経発生過程において重要な役割を担うことが知られている。そこでテニューリン2のシナプス形成における役割について解析することを目的としてその配列を検討したところ、微小管との相互作用がシナプス形成に関与する可能性が見出された。そこでテニューリン2の微小管相互作用部位を単独で過剰発現させたところ、抑制性シナプスの形成が阻害された。このことから、テニューリン2が微小管依存的に抑制性シナプスを誘導することを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chen Shuo, Weitemier Adam Z., Zeng Xiao, He Linmeng, Wang Xiyu, Tao Yanqiu, Huang Arthur J. Y., Hashimoto Yuki, Kano Masanobu, Iwasaki Hirohide, Parajuli Laxmi Kumar, Okabe Shigeo, Teh Daniel B. Loong, All Angelo H., Tsutsui-Kimura Iku, Tanaka Kenji F., Liu Xiaogang, McHugh Thomas J.	4. 巻 359
2. 論文標題 Near-infrared deep brain stimulation via upconversion nanoparticle-mediated optogenetics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 679 ~ 684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aag1144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takahashi-Nakazato Ai, Parajuli Laxmi Kumar, Iwasaki Hirohide, Tanaka Shinji, Okabe Shigeo	4. 巻 1941
2. 論文標題 Ultrastructural Observation of Glutamatergic Synapses by Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy (FIB/SEM)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 17 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9077-1_2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Parajuli Laxmi Kumar, Urakubo Hidetoshi, Takahashi-Nakazato Ai, Ogelman Roberto, Iwasaki Hirohide, Koike Masato, Kwon Hyung-Bae, Ishii Shin, Oh Won Chan, Fukazawa Yugo, Okabe Shigeo	4. 巻 7
2. 論文標題 Geometry and the Organizational Principle of Spine Synapses along a Dendrite	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0248-20.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Mizuno Shota, Hirota Jun-na, Ishii Chiaki, Iwasaki Hirohide, Sano Yoshitake, Furuichi Teiichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Comprehensive Profiling of Gene Expression in the Cerebral Cortex and Striatum of BTBRtf/ArtRbrc Mice Compared to C57BL/6J Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2020.595607	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirohide Iwasaki	4. 巻 70
2. 論文標題 Understanding the Principles of Neural Circuit Formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Kitakanto Medical Journal	6. 最初と最後の頁 387~388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩崎広英
2. 発表標題 走査型電子顕微鏡による樹状突起スパインの三次元再構築
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sotaro Ichinose, Hirohide Iwasaki
2. 発表標題 The roles of teneurin-2 in neuron
3. 学会等名 第43回 日本神経科学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩崎広英
2. 発表標題 中枢神経系の神経回路解析のための光-電子相関顕微鏡法によるアプローチ
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------